

A DNS-chip technológiák jelentősége a klinikumban

Dr. Puskás László

MTA, Szegedi Biológiai Központ, Funkcionális Genomika Laboratórium

Összefoglalás

A klinikai kutatások során egyes betegségekhez tartozó génkifejeződési mintázatok megfejtése kifejezetten fontos a modern kutatások számára. Nem csak alapkutatási jelentőséggel bír, de a terápia megválasztásában, a betegség pontos diagnosztizálásában is fontos szerepet kapnak az egyedi esetek polimorfizmusvizsgálatai és génaktivitási mintázatai. A hagyományos megközelítések mellett egyre fontosabbak az olyan új módszerek, amelyek átfogó globális szűrőmódszerekkel dolgoznak, mint amilyen a DNS- vagy a fehérje-chip technológia. Ezekkel a módszerekkel nem csak a betegségek molekuláris szintű megértésére nyílik mód, hanem a betegségek kialakulási mechanizmusának, esetleges tulajdonságainak korai azonosítására is felhasználhatók. A klinikai kutatások mellett a gyógyszerkutatásokban is kiemelkedő szerep jut a DNS-chip technológiának. Gyógyszerhatóanyagok hatásának felderítésére a DNS- és fehérje-chip technika olyan esetekben lehet nagyon hasznos, amikor a potenciális gyógyszermolekula hatásmechanizmusát vagy molekuláris célpontjait nem ismerjük. A chipmódszereknél nagy előny, hogy néhány kísérletben nem csak néhány, gyanúsítható célmolekula mennyiségi vagy minőségi változása határozható meg, hanem elvileg lehetőség van több ezer fehérje vagy akár a teljes génállomány változásainak detektálására is. Így olyan információ halmazhoz jutunk, amely az eddigi módszerekkel nem volt lehetséges. Ennek a forradalmi technológiának a létrejöttét a miniaturizálás, a robot-technika és az informatika fejlődése tette lehetővé.

Bevezetés

A különböző megbetegedések modern molekuláris módszereken alapuló osztályozásának két alapvető kihívása az új betegségcsoportok felderí-

tése, valamint a már diagnosztizált vagy új esetek egy már meglévő csoportba való besorolása, amely előre vetítheti a kezelést és a betegség várható kimenetelét. A különböző gyulladásos folyamatok, fertőzés okozta megbetegedések, pszichiátriai kórképek vagy genetikai hibák okozta öröklődő megbetegedések végeredményben génkifejeződésbeli eltéréseket okoznak. Ezeknek a patológiás eseteknek az egészségeshez viszonyított több ezer génen vagy akár az összes eddig ismert génen történő génaktivitási mintázat meghatározása nagy kihívást jelentett a molekuláris biológusoknak, klinikai genetikusoknak. Nagy áttörést jelentett a DNS-chip technika kidolgozása és bevezetése. Az említett betegségek mellett különösen fontos a daganatos megbetegedések esetében a génexpressziós vizsgálatok, a kromoszómarendellenességeket felderítő tanulmányok. A daganatos sejtek genetikai hibái, melyek alapvetően meghatározzák a normálistól eltérő viselkedésüket, ma már a humán genom majdnem teljes szekvenciájának és a nagy áteresztőképességű molekuláris biológiai módszerek (teljes genomra kiterjedő mutációanalízis, összehasonlító genomi hibridizáció, génexpresszió monitorozás cDNS chipekkel) ismeretében az eddiginél hatásosabban analizálhatók. Az így kapott eredmények pedig kiválóan kamatoztathatók a megelőzés, a diagnózis, az osztályozás, a terápia és a betegség kimenetelével kapcsolatos kérdések megválaszolásában. (1-4)

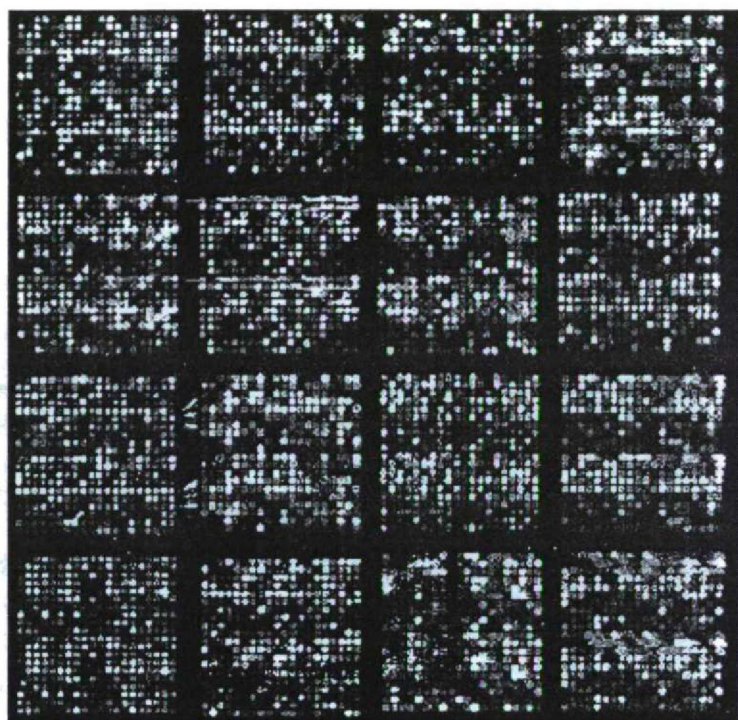
DNS-chip technológia

A humán genom projekt keretében ma már korlátlan hozzáférési lehetőség van a gének szekvenciáit és lokalizációját tartalmazó adatbázisokhoz, nagyban segítve ezzel a kromoszóma rendellenességek felderítését, a génexpressziós mintázat szisztematikus meghatározását, mely nemcsak a sejtek normális működésének megértése szempontjából nagyon fontos, hanem hozzájárul olyan új gének azonosításához, melyek adott betegségcsoportra markerként jellemzőek, és terápiás szempontból potenciális gyógyszer-célpontok lehetnek. A huszadik század második feléig a gének funkciójának és szabályozásának tanulmányozása egyedi gének lépésről lépésre történő vizsgálatán alapult. Tekintve, hogy egyre több organizmus genomjának szekvenciája vált és válik teljesen vagy részlegesen ismertté, számos új technika fejlődött ki, melyek a génfunkciók szisztematikus analízisét teszik lehetővé. A technikák közül az egyik nagykapacitású, könnyen automatizálható módszer a DNS-chip technológia, mely forradalmasította a molekuláris biológiát, a funkcionális genomikát és napjainkban a klinikai diagnosztikai módszereket is [5-7].

A DNS-chip egy olyan meghatározott mintázatban felvitt és kihorgonyozott nagy számú (100–1.000.000) kölcsönható DNS mintát tartalmazó szilárd hordozó (legtöbbször üveg, de lehet arany vagy speciális műanyag felület is), amely a hibridizálás során (az egyszálú DNS komplementer szakaszok specifikus kölcsönhatásából adódó kettős szál képződés) alkalmas adott biológiai mintából kinyert DNS vagy RNS mennyiségi jellemzésére (1. ábra). Minden egyes kölcsönható minta egy génre vagy DNS szakaszra specifikus, amelynek pozícióját ismerjük a szilárd felületen.

A genom aktív részére összpontosító technikák segítségével a daganatos sejtek génkifejeződési mintázata határozható meg. Az első technika, mely lehetővé tette differenciáltan működő gének azonosítását és klónozását, a szubsztraktív hibridizáláson alapult. Később egy új technika, a differenciális display PCR (DD-PCR) vette át ennek a módszernek a szerepét (Liang et al., 1992). Napjaink forradalmian új eszköze, a DNS-chip (DNS-microarray, DNS-síkmátrix) technológia, mely lehetővé teszi, hogy az egyes sejtekben egy adott időpontban jelenlévő mRNS populáció egyetlen hibridizációs lépésben, tárgylemeznyi felületen analizálható, s az adott sejt expressziós mintázata meghatározható (7-11).

Két (beteg illetve egészséges kontroll) mintából származó RNS két spektrális tulajdonságaiban eltérő fluoreszcens festékkel jelölhető, amelyeket egy DNS-chipen hibridizálva, majd egy nagyfelbontású lézerszkenneres leolvasás után meghatározhatók az egyes gének relatív kifejeződése. A gén aktivitása az adott pontban detektálható fluoreszcens jel intenzitásával arányos. Ha egy pontban a kezelt mintából származó fluoreszcens jel erősebb, az azt jelenti, hogy a betegség hatására az adott gén aktivitása megemelkedett. Ezek között a gének közül számos olyan fordulhat elő, amely a betegség kialakulásával, progressziójával kapcsolatos. Rákos minták esetében a megemelkedett szintet mutató mRNS-ek onkogének termékeit, metasztázist elősegítő proteázokat, a sejtciklusban szereplő fehérjéket kódolhatnak. Ugyanilyen mintákban alacsonyabb szintű expresszióban például tumor szupresszor gének, vagy az apoptózisban szerepet játszó gének szerepelnek. Egy DNS-chippel történő globális transzkripció szűrés alkalmával számos olyan eltérő kifejeződést mutató génre is fény derül, amelyeknek funkciója egyelőre nem ismert a daganatos megbetegedések patológiájában.



1. ábra.

A DNS-chipen több ezer (akár százezer) különböző gén aktivitását is nyomon tudjuk követni. Minden egyes pont egy génre jellemző szekvenciát tartalmaz. A biológiai mintából kinyert, majd fluoreszcensen megjelölt RNS a gén aktivitásával arányos fluoreszcens jelet ad

A DNS-chipek egyik csoportjába az általában szintetikus oligonukleotid mintákat tartalmazó microarray-ek tartoznak, másik csoportjukon cDNS fragmentek vannak kihorgonyozva, és ezáltal génexpressziós változások detektálására, monitorozására alkalmas. A DNS-chipek legfontosabb és leginformatívabb alkalmazása a génexpresszió párhuzamos tanulmányozása, ami a genom funkcionálisan aktív részeire összpontosít. A technika segítségével jelentősen hatékonyabbá válik az adott állapotra (kóros, gyógyszerrel kezelt, esetleg más fiziológiai körülmények között fellépő) jellemző, vagy azt az állapotot kiváltó gének azonosítása, mely mind az alap, mind az alkalmazott kutatásban kamatoztatható (12). Az egyes, az előző fejezetben taglalt kromoszóma rendellenességekhez társuló

génexpresszió változások kiderítése kulcsfontosságú diagnosztikus és terápiás értékkel bírhat. Klinikai szempontból a DNS-chip vizsgálatok egyértelműen életképes alternatívát jelentenek a daganatos betegségek diagnosztikájában a hagyományos módszerekkel szemben (kariotipizálás vagy a fluoreszcens *in situ* hibridizálás) különösen olyan esetekben, amikor a kromoszóma rendellenesség citogenetikailag nem mutatható ki.

Az utolsó másfél évtized technikai újításai forradalmasították a daganatok és más patológiás elváltozások molekuláris szintű megértését, funkcionális genomikai háttérének felderítését, diagnosztikai markerek azonosítását. A technikák egy része a genom szintű elváltozások detektálására törekszik (mutációk, génamplifikációk, deléciók, metilációs mintázat), míg más részük az aktív gének termékeinek, az RNS populációknak (transzkriptom) analízisét tűzte ki célul (génexpressziós vizsgálatok, SAGE, DD-RT-PCR, DNS-chip technika). Exponenciálisan nő azoknak a tanulmányoknak a száma, melyek a különböző típusú rákos megbetegedésekkel a funkcionális genomikai szemszögből foglalkoznak, mint pl. melanoma (2), vastagbélrák (13), pajzsmirigy rák (14), emlőrák (15), prosztatarák (16). Az elkövetkező években ezen technikák remélhetőleg a klinikai gyakorlatban is felhasználhatók lesznek, segítve a diagnosztikát, a betegség kimenetelének prognosztizálását, a helyes terápia kiválasztását.

A DNS-chipek nem csak a gének aktivitásának meghatározására alkalmasak, hanem a génállomány eltéréseinek pontos kimutatására is. Így a DNS-chipek használatával lehetővé válik egyes nukleotid eltérések (polimorfizmusok, mutációk) nagyszámú egyidejű tesztelése is, amely többek között a betegségre hajlamosító gének felfedezésében, az egyéni gyógyszerérzékenység kimutatására is felhasználható.

DNS-chipek gyártása

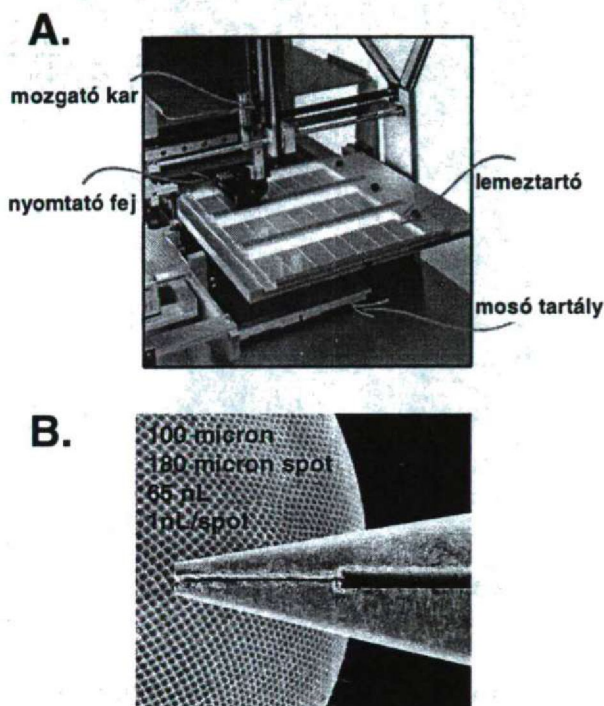
A makroarray-ekben a próbák (vagyis például a vizsgálandó gének) száma kevesebb. Készítését akár lemez blottoló készülékkel, kézi felcseppentéssel is el lehet végezni, azonban nagyobb számú makroarray és több, mint 100 génspecifikus próba esetében a mikroarray-ekhez hasonlóan cseppentő robotot használnak. A mikro- és makroarray-ek esetében a hosszabb cDNS alapú mintákat vagy mechanikusan, vagy a tintasugaras nyomtatókból ismert „ink-jet” módszerrel viszik fel. A mechanikus felvitelt egy robot végzi el nagy pontossággal. A nyomtatófej 4-32 finoman megmunkált tűt tartalmaz, mely vékony kapilláris csatornájába veszi fel a

DNS-t tartalmazó mintát (2.B. ábra), és a mikroszkóp lemezhez érintve a felületi feszültség és a kapilláris erő meghatározta nagyságú cseppet (1-10 nl és kb. 100-250 μm átmérőjű) hagy a felületen (2.A. ábra). Az ink-jet technológia elektromos áram hatására ejt le egy nagyon pontosan meghatározott nagyságú cseppecskét, tehát nem ér a mikroszkóplemez felületéhez, ami egységes morfológiájú pontokat eredményez. Oligonukleotid alapú mikro- és makroarray-ek hasonló technikákkal is készíthetők.

Betegségre jellemző génaktivitási mintázatok

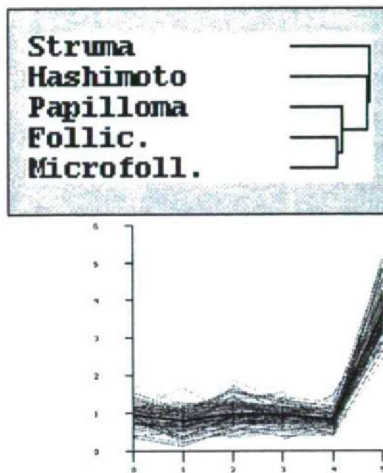
Laboratóriumunkban, az MTA Szegedi Biológiai Központ Funkcionális Genomika Laboratóriumában különböző pajzsmirigymegbetegedésben szenvedő betegek mintáit dolgoztuk fel abból a célból, hogy olyan génmarkereket azonosítsunk, amelyek csak egyes megbetegedésekre jellemzőek. Ezeknek a géneknek az ismeretében nem csak az egyes megbetegedések molekuláris szintű megértéséhez kerülünk közelebb, de az egyedi eltéréseket és esetleges alcsoportokat is képesek leszünk meghatározni. Sebészetileg eltávolított natív pajzsmirigy mintákat dolgoztunk fel struma, Hashimoto-szindróma, papillóma, follikuláris és mikrofollikuláris karcinómás esetekből. Teljes RNS-t tisztítottunk a mintákból, majd fluoreszcensen jelzett nukleotidok jelenlétében cDNS-sé írtuk át (= jelölés). A kapott mintákat 3200 különböző emberi génre jellemző hosszabb DNS-próbákat tartalmazó cDNS-chipre vittük fel (= hibridizáció). A DNS-chipek mosása után csak a 3200 gén közül valamelyikével kölcsönható fluoreszcensen jelölt szekvenciák maradtak a lemezen és kötődtek ki a megfelelő helyekre. Minden egyes pontra meghatároztuk az intenzitásértékeket, és a kontroll egészséges pajzsmirigyszövethez hasonlítottuk a gének kifejeződés mértékét. Minden egyes beteg mintájához tehát egy 3200 aránypárból álló adathalmazt, relatív génkifejeződési mintázatot kaptunk. 30 minta feldolgozása után közel egy millió adat állt rendelkezésünkre. Ezeknek a feldolgozását hierarchikus klaszteranalízissel végeztük el (17). Ennek a módszernek a felhasználásával sikerült azoknak a géneknek a csoportjait meghatározni, amelyek csak az egyes betegségtípushoz tartoztak. Az eredményeket a 3. ábra szemlélteti. Az adott csoporthoz tartozó gének az adott betegségtípusra jellemzőek, azoknak markerei, amelyeket a diagnózis felállításában vagy az egyedi esetek jellemzésére lehet felhasználni. A géneken kívül a teljes génkifejeződési mintázat alapján a betegségek családfája, kapcsolatai is megállapíthatók. A módszer hatékonyságát jól szemlélteti, hogy a follikuláris és a mikrofollikuláris karcinóma állt génexpresszió alapján a legközelebb, majd ezt a csoportot

követte a papillóma. A Hashimoto-szindróma és a struma elkülönült csoportot alkottak.



2. ábra.
A mechanikus chip
nyomtató robot (A)
és a nyomtatótű
elektronmikroszkó-
pos képe és nyomta-
tási paraméterei (B).

A pajzsmirigy megbetegedések génexpressziós jellemzése mellett laboratóriumunkban kemoterápiás szerre különböző érzékenységű melanómák és glomerulonephritis eseteinek transzkripció szintű jellemzésén is dolgozunk.



3. ábra.

Különböző pajzsmirigy eredetű megbetegedések génaktivitási mintázat alapján történő csoportosítása. Bal felső képen a betegségek klaszterezése, alul csakis a strumára jellemző génmarkerek láthatók. Jobb oldalon függőleges oszlopok egyes minták génexpressziós mintázatát jelölik, míg a sorok egyes génekre utalnak (zöld represszált, piros indukálódott gént jelöl)

Kitekintés

Összefoglalva, az emberi géntérkép befejezésével, egy kérdéses betegség megértéséhez és gyógyításához szükség van a genomika, proteomika korai alkalmazásának integrálására abból a célból, hogy jobban megértsük a betegségek patomechanizmusát, sokkal hatásosabb diagnózist állíthassunk fel és eredményesebb terápiát alkalmazzunk. A posztgenomikai felfedezés fő feladata a markerként használható gének azonosítása és a technológiai háttér klinikai alkalmazásainak megalapozása. Az új génmarkerek a hagyományos és az újabban felmerülő betegségekre specifikusabb, hatékonyabb és biztonságosabb diagnózist és terápiás beavatkozásokat biztosítanak, míg a gyógyszerfejlesztés tekintetében a hatóanyag-

felfedezésre fordított idő jelentősen lecsökken és megnövekszik a felfedezési folyamat valószínűségének sikere.

Köszönetnyilvánítás

A közlemény P.L.G. a TISZA-PARTI Gyermekgyógyászati Esték 2005. évi április 5-diki tudományos konferencián elhangzott előadás anyagából állt össze. A cikkben bemutatott saját eredmények a MEH-MTA együttműködés keretében folytatandó kutatás támogatásával valósultak meg (40.232/1/2005). Köszönettel tartozok a Funkcionális Genomikai Laboratóriumban dolgozó dr. Zvara Ágnesnek, dr. Hackler Lászlónak, Fehér Liliánának, Kelemen János Zsigmondnak és Varga-Orvos Zoltánnak munkájukért.

Irodalomjegyzék

1. DeRisi J, Penland L, Brown P, Bittner M, Meltzer P, Ray M, Chen• Y, Su Y, Trent J. (1996) Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nature Genet*, **14**:457-460
2. Hedenfalk I, Duggan D, Chen Y, Radmacher M, Bittner M, Simon R, Meltzer P, Gusterson B, Esteller M, Kallioniemi OP, Wilfond B, Borg A, Trent J. (2001) Gene-expression profiles in hereditary breast cancer. *N Engl J Med*. **344**:539-48.
3. Khan J, Saal LH, Bittner ML, Jiang Y, Gooden GC, Glatfelter AA, Meltzer PS. (2002) Gene expression profiling in cancer using cDNA microarrays. *Methods Mol Med*. ;**68**:205-22.
4. Sidransky D. (2002) Emerging molecular markers of cancer. *Nature Rev Cancer* **2**:210-219.
5. Nguyen, D.V., Arpat, A.B., Wang, N., Carroll, R.J. (2002) DNA microarray experiments: biological and technological aspects. *Biometrics* **58**: 701-717.
6. Zvara, A., Hackler L.Jr, Nagy, Z.B., Micsik, T., Puskas, L.G. (2003) New molecular methods for classification, diagnosis and therapy prediction of hematological malignancies. *Pathol Oncol Res*. **8**: 231-240.
7. Raetz, E.A., Moos, P.J. (2004) Impact of microarray technology in clinical oncology. *Cancer Invest*. **22**: 312-320.
8. Kopper, L., Timar, J. (2002) Gene expression profiles in the diagnosis and prognosis of cancer. *Magy. Onkol.*, 46:3-9.

9. Ernst T, Hergenhausen M, Kenzelmann M, Cohen CD, Bonrouhi M, Weninger A, Klaren R, Grone EF, Wiesel M, Gudemann C, Kuster J, Schott W, Staehler G, Kretzler M, Hollstein M, Grone HJ. (2002) Decrease and gain of gene expression are equally discriminatory markers for prostate carcinoma: a gene expression analysis on total and microdissected prostate tissue. *Am J Pathol* **160**:2169-2180.
10. Blohm DH, Guiseppi-Elie A. (2001) New developments in microarray technology. *Curr Opin Biotechnol* **12**:41-47.
11. Stremmel C, Wein A, Hohenberger W, Reingruber B (2002) DNA microarrays: a new diagnostic tool and its implications in colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* **17**(3):131-136.
12. K. Kitajka, L. G. Puskás, Á. Zvara, L. Hackler, Jr., G. Barceló-Coblijn, Y. K. Yeo, and T. Farkas (2002) The role of n-3 polyunsaturated fatty acids in brain: Modulation of rat brain gene expression by dietary n-3 fatty acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:2619-2624.
13. Suzuki H, Gabrielson E, Chen W, Anbazhagan R, van Engeland M, Weijnenberg MP, Herman JG, Baylin SB. (2002) A genomic screen for genes upregulated by demethylation and histone deacetylase inhibition in human colorectal cancer. *Nat Genet* **31**:141-149.
14. Huang, T.H.-M., Perry, M.R. and Laux, D.E. (1999) Methylation profiling of CpG islands in human breast cancer cells. *Hum. Mol. Genet.*, **8**:459-470.
15. Jiang Y, Harlocker SL, Molesh DA, Dillon DC, Stolk JA, Houghton RL, Repasky EA, Badaro R, Reed SG, Xu J. (2002) *Oncogene* **21**(14):2270-2282.
16. Luo JH, Yu YP, Cieply K, Lin F, DeFlavia P, Dhir R, Finkelstein S, Michalopoulos G, Becich M. (2002) *Mol Carcinog* **33**(1):25-35.
17. Puskas LG and Farid NR (2004) Gene Expression in Thyroid Tumors. In: *Molecular Basis of Thyroid Cancer* (ed. Nadir R. Farid) (Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands)